

МЕТОДИКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ПРИНУДИТЕЛЬНОГО ДОЗИРОВАННОГО ЗАРАЖЕНИЯ БЛОХ МИКРОБАМИ ЧУМЫ

А. Н. Алексеев, В. А. Бибилова и Н. М. Хрущевская

Центральный научно-исследовательский институт дезинфекции и дезинсекции
Минздрава СССР, Москва, и Средне-азиатский научно-исследовательский
противочумный институт, Алма-Ата

Изучение взаимоотношений между возбудителем чумы и специфическим переносчиком имеет не только теоретическое, но и практическое значение, так как обнаруживает подлинную роль тех или иных видов блох как в поддержании эпизоотического процесса в природе, так и в сохранении или утрате вирулентных свойств самим микробом. Роль организма блохи, как среды обитания микроба, показана в ряде работ (Bacot a. Martin, 1914; Douglas a. Wheeler, 1943; Бибилова и Сахарова, 1955; Бибилова, Волохов, Егорова, 1957; Балашов, Бибилова, Мурзахметова, 1961; Бибилова и др., 1964).

Большое значение имеет выяснение потенциальных способностей передачи чумы разными видами блох и определение минимальных доз возбудителя, необходимых для массового размножения микробов в блохах. Все это привело экспериментаторов к мысли о необходимости управляемого заражения блох с тем, чтобы процесс заражения не зависел от различий в интенсивности и массивности бактериемии у хозяев прокормителей блох и находился под контролем экспериментатора. Так, Картмен (Kartman, 1954) разработал специальный аппарат для экспериментального кормления блох, Тифлов (1964) использовал для заражения блох аппарат Пшеничного-Райхера. Бибилова, Шашаев, Шапиро, Решетникова (1964) использовали методику Лисовой (1952) для заражающего кормления блох на шкурке мышинных хвостов и т. п. Но ни один из упомянутых методов не позволяет вводить отдельным блохам известные количества заражающей жидкости с определенным числом микробов в ней, особенно жидкости не содержащей крови, не позволяет наблюдать за скоростью питания и учитывать точные объемы выпитой жидкости, а также получать смывы фекалий, получаемых непосредственно в процессе питания. Ни один из существующих методов не дает полной уверенности в заражении каждой отдельной особи.

Предложенный нами (Алексеев, 1965) аппарат для принудительного заражающего кормления насекомых позволяет преодолеть все эти трудности. Сущность метода состоит в том, что хоботок фиксированной в вакуум-держателе блохи вставляется в капилляр с заражающей жидкостью и блоха накармливается ею. Капилляр впаян в микропипетку, смещение мениска жидкости в которой отмечается на экране проекционного микроскопа с точностью до 0.025 мкл.

С помощью описанного прибора удалось принудительно накормить блох (самцов и самок) следующих видов: *Ceratophyllus laeviceps* Wagn., *Xenopsylla gerbilli minax* Jord., *X. cheopis* Rots. и *Leptopsylla segnis* Sch. жидкостями, содержащими дефибрированную или гемолизированную кровь различных животных (лошади, морской свинки, крысы, песчанки),

а также взвесью микробов в бульоне Хоттингера. В опытах использовали блох из лабораторной культуры на IV—V стадии переваривания крови (по И. Г. Иоффу), голодавших до опыта в течение 2—3 суток.

ПОРЯДОК РАБОТЫ

Аппарат устанавливают на столе над большой кюветой с раствором лизола, что исключает случайную утерю зараженной блохи. Непосредственно под капилляр на станину прибора подстилают салфетку, смоченную лизолом. Кормление блох производится только подогретой жидкостью, поэтому микротермостат, в котором находится конец микропипетки, все время включен и отрегулирован на температуру 37°C .

В микропипетку ассистент поршневым нагнетателем набирает заражающую жидкость, после чего пипетку укладывают на подставку с продольным углублением, покрытую смоченной лизолом салфеткой. Кончик пипетки, в который впаивают капилляр, нависает над чашкой Петри с лизолом. До начала работы и в конце ее из пипетки под контролем

бинокля с помощью пастеровской пипетки с оттянутым в капилляр концом берут мерное количество жидкости (0.1—0.2 мл), которое затем титруют для определения исходного и заключительного количества микробных тел в заражающей смеси. Сама заражающая жидкость приготавливается из взвеси микробов (1—2 млрд по оптическому стандарту) в физиологическом растворе или бульоне Хоттингера с добавлением крови. Пипетку

с впаянным парафином капилляром устанавливают в приборе. Затем блоху фиксируют в вакуум-держателе. От правильности и надежности фиксации насекомого в значительной степени зависит успех принудительного кормления. Применяемый вакуум-держатель сходен с описанным ранее (Алексеев, 1965), но наконечник несколько иной, фиксирующий блоху более надежно и легко стерилизуемый обжиганием (изготовлен из дюралюминия, рис. 1). Важен также наклон продольной оси тела блохи по отношению к оси капилляра. Как видно из рис. 2, этот угол должен составлять 50° . Блоху укладывают спинной стороной в бороздку наконечника вакуум-держателя, следя за тем, чтобы голени и лапки блохи были фиксированы, а хоботок находился в поле зрения бинокля.

Вакуум-держатель с помощью микроманипулятора подводят к кончику капилляра с тем, чтобы определить, можно ли одним—двумя движениями ввести хоботок блохи внутрь капилляра. Затем кончик капилляра отрезают, стараясь при этом отрезать его так, чтобы срез был вертикальным, так как в противном случае при неровном срезе быстро образуется подсыхающая пробка из заражающей жидкости. Пробка образуется примерно за 30 сек. при использовании смеси, состоящей из равных частей 1-миллиардной культуры *P. pestis* и гемолизированной лошадиной крови и за 3—5 сек. при использовании дефибринированной крови.

Рис. 2. Наклон продольной оси тела блохи по отношению к капилляру, позволяющий вводить хоботок в просвет капилляра ($\alpha = 50^{\circ}$). Вид сбоку. Схема.

А — капилляр, Б — наконечник вакуум-держателя.

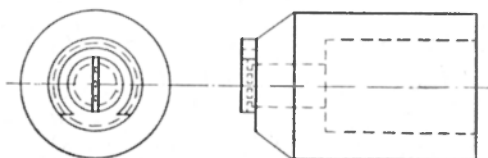


Рис. 1. Чертеж дюралюминиевого наконечника вакуум-держателя для фиксации блох в момент кормления. Диаметр отверстий, к которым присасывают блоху, 0.15—0.2 мм. Масштаб 5 : 1.

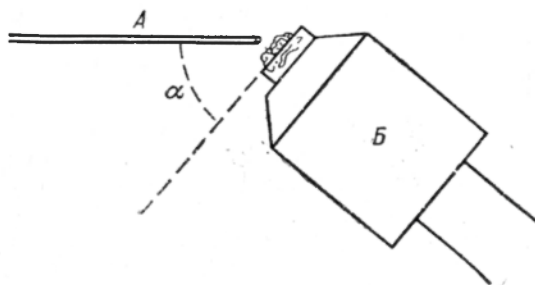


Рис. 2. Наклон продольной оси тела блохи по отношению к капилляру, позволяющий вводить хоботок в просвет капилляра ($\alpha = 50^{\circ}$). Вид сбоку. Схема.

А — капилляр, Б — наконечник вакуум-держателя.

отношению к оси капилляра. Как видно из рис. 2, этот угол должен составлять 50° . Блоху укладывают спинной стороной в бороздку наконечника вакуум-держателя, следя за тем, чтобы голени и лапки блохи были фиксированы, а хоботок находился в поле зрения бинокля.

Вакуум-держатель с помощью микроманипулятора подводят к кончику капилляра с тем, чтобы определить, можно ли одним—двумя движениями ввести хоботок блохи внутрь капилляра. Затем кончик капилляра отрезают, стараясь при этом отрезать его так, чтобы срез был вертикальным, так как в противном случае при неровном срезе быстро образуется подсыхающая пробка из заражающей жидкости. Пробка образуется примерно за 30 сек. при использовании смеси, состоящей из равных частей 1-миллиардной культуры *P. pestis* и гемолизированной лошадиной крови и за 3—5 сек. при использовании дефибринированной крови.

Внутренний диаметр капилляра должен быть примерно на $\frac{1}{3}$ шире диаметра хоботка блохи (30—35 мк), так как в слишком узкий просвет капилляра крайне трудно ввести гибкие колющие ротовые органы блохи, в особенности очень короткий и гибкий хоботок *X. cheopis*, спрятанный к тому же между мощными коксами передних конечностей.

Кормление блохи *C. laeviceps* через капилляр показано на рис. 3.

Положение хоботка относительно капилляра не является вполне безразличным для начала и скорости питания блох, однако наши наблюдения показали, что одного вставления кончика хоботка в капилляр достаточно для того, чтобы 46% самок *X. gerbilli minax* начали питаться в течение первых двух минут (наблюдение над 74 особями). Сам факт питания

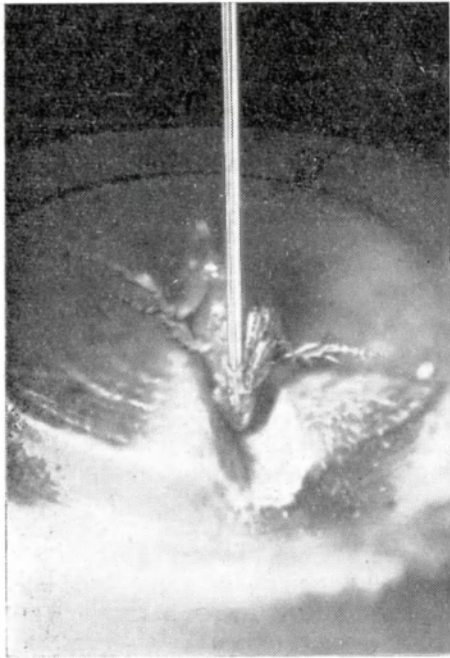


Рис. 3. Кормление через капилляр самки *Ceratophyllus laeviceps*. Вид сверху. Увеличение бинокюляра 4×12.5.

хорошо виден и легко контролируется визуально как по наличию сосательных движений, так и по видимому наполнению желудка, а также по движению жидкости в капилляре. Продолжительность питания, степень насыщения, время начала питания зависят от физиологического состояния блох и от свойств кормовой жидкости, скорее всего от «вкуса» входящей в ее состав крови.

По окончании кормления накопленный вакуум-держателя вставляют в чистую пробирку (над кюветом с лизолом) и пережимают вакуумный шланг. Блоха падает в пробирку. Пятна фекалий хорошо заметны на светлой поверхности вакуум-держателя и их смывают 0.9 мл бульона Хоттингера в стерильную пробирку.

Кормление различных видов блох имеет свои особенности. Так, мощный хоботок крупных блох *C. laeviceps* легко может быть вставлен в капилляр при увеличении бинокюляра 2×12.5. Если при этом ось хоботка строго горизонтальна, то можно ввести в капилляр весь хоботок так, как это показано на рис. 3. Причем, если использовать достаточно узкий

капилляр (около 30—35 мк), то можно добиться введения в его просвет только эпифаринкса, оттеснив краями капилляра лацинии. Введение хоботка *X. gerbilli minax* легче всего достигается в тех случаях, когда головная часть блохи несколько запрокинута и хоботок расположен не строго горизонтально, а слегка приподнят. При этом достаточно ввести в капилляр одну треть хоботка (эпифаринкс и лацинии вместе). Увеличение должно быть не менее 4×12.5 или 7×12.5.

Использование подобной методики позволяет осуществлять кормление блох (от поймки и фиксации до вставления хоботка) за 1.5—2 минуты. Само кормление занимает от 3 до 15 минут. Всего нами было накормлено, точно известными количествами жидкости, за 15 рабочих дней 158 блох *X. gerbilli minax*, 49 *C. laeviceps* и 2 самки *X. cheopis*. Остальные блохи, а их всего было 502, были использованы в опытах по определению переживания микробов на их зараженных хоботках, а также в опытах по механической передаче возбудителя восприимчивым животным.

Следует отметить, что эта методика обеспечивает полную безопасность работы и исключает возможность утраты зараженных особей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемый метод позволяет:

1. Вводить блохам — переносчикам чумы точно дозированное количество заражающих жидкостей, в том числе и не содержащих крови. Причем, зная исходные количества микробных тел в определенном объеме, можно рассчитывать количество микробов, поглощаемых блохой.
2. Регулировать объем и количество заражающего материала путем изменения концентрации микробов или путем прекращения питания после поглощения определенного количества инфицирующего материала.
3. Изучать сохранение микробов *P. pestis* на ротовых органах блох путем загрязнения хоботка (и только хоботка) этих эктопаразитов.
4. Исследовать наличие микробов в фекалиях блох, извергнутых блохами непосредственно в процессе питания.
5. Учитывать скорость поглощения различных кормовых жидкостей и наблюдать за самим процессом питания.
6. Наблюдать визуально наличие или отсутствие «отрыжки» у незараженных, зараженных и «блокированных» блох.

Л и т е р а т у р а

- Алексеев А. Н. 1965. Принудительное дозированное кормление насекомых. Мед. паразитол. и паразитол. болезни, : 467—471.
- Бибикова В. А., Сахарова В. В. 1955. Влияние температуры и физиологических особенностей блох на их активность как переносчиков в экспериментальных условиях. Тез. докл. VIII совещ. по паразитол. пробл. : 24.
- Бибикова В. А., Волохов В. А. и Егорова Р. П. 1957. Влияние условий среды на возбудителя чумы в блохах. Тез. докл. IX совещ. по паразитол. пробл. : 19—20.
- Балашов Ю. С., Бибикова В. А., Мурзахметова К. 1961. Блоха как среда обитания чумного микроба. Сообщ. I. Питание и переваривание крови у незараженных блох. Нарушение клапанной функции преддверия преджелудка. Матер. научн. конфер., посвящ. 40-летию Казахской ССР. Алма-Ата : 27—30.
- Бибикова В. А., Хрустцелевская Н. М. 1964. Одно из направлений изучения блох и возбудителя чумы. Матер. IV научн. конф. по природн. очагов. и профил. чумы, Алма-Ата : 33—34.
- Бибикова В. А., Шашаев М. А., Шапиро И. Л., Решетникова П. И. 1964. К методике лабораторного кормления блох при изучении их роли в хранении и переносе возбудителей заразных болезней. Мед. паразитол. и паразитол. болезни, 6 : 739—740.
- Лисова А. И. 1952. Метод кормления москитов взвесью лейшманий, Мед. паразитол. и паразитол. болезни, 6 : 550—553.
- Тифлов В. Е. 1964. Судьба бактериальных культур в организме блох. Сб. Эктопаразиты (4) : 181—198.
- Vacot, A. & Martin, C. 1914. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. Journ. Hyg., Plague Suppl. III : 423—439.
- Douglas, I. & Wheeler C. 1943. Sylvatic Plague Studies. II. The Fate of *Pasteurella pestis* in the Flea. J. Inf. Dis., 72 (1) : 19—30.
- Kartman, L. 1954. Studies on *Pasteurella pestis* in Fleas. I. An Apparatus for the Experimental Feeding of Fleas. Exp. Parasitol., 8 (5) : 525—537.

THE TECHNIQUE OF INDIVIDUAL COMPULSORY DOSE INFECTION OF FLEAS WITH PLAGUE MICROBES

A. N. Alekseev, V. A. Bibikova and N. M. Khrustzelevskaya

S U M M A R Y

The technique of feeding of fleas through capillary with various infectious media (Hottinger's broth, defibrinated and haemolysed blood of horse, guinea pig, rat, gerbil) is described. For the tests there were used fleas (♂♂ and ♀♀) of gerbils (*Xenopsylla gerbilli minax* Lord and *Ceratophyllus laeviceps* Wagn.), mices (*Leptopsylla segnis*) and rats (*X. cheopis*).

This technique allows to infect fleas with precise quantity of suspension of plague microbes of definite concentration, to observe the process of feeding of normal and infected fleas, to observe the defaecation and to obtain the washes of infested faeces.